

12 **DEMANDE DE BREVET EUROPEEN**

21 Numéro de dépôt: 89401857.1

51 Int. Cl.<sup>5</sup>: **A 61 K 9/127**

22 Date de dépôt: 28.06.89

30 Priorité: 30.06.88 FR 8808874

43 Date de publication de la demande:  
03.01.90 Bulletin 90/01

84 Etats contractants désignés:  
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

71 Demandeur: **CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE (CNRS)**  
15, Quai Anatole France  
F-75007 Paris (FR)

72 Inventeur: **Stainmesse, Serge**  
8 rue Spinoza  
F-94600 Choisy Le Roi (FR)

**Fessi, Hatem**  
9 rue Friant  
F-75007 Paris (FR)

**Devissaguet, Jean-Philippe**  
14 Bd. d'Inkermann  
F-92200 Neuilly sur Seine (FR)

**Puisieux, Francis**  
66 rue de Strasbourg  
F-94700 Maisons-Alfort (FR)

74 Mandataire: **Varady, Peter et al**  
Cabinet Lavoix 2, Place d'Estienne d'Orves  
F-75441 Paris Cedex 09 (FR)

54 **Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles de lipides amphiphiles sous forme de liposomes submicroniques.**

57 Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles de lipides amphiphiles, sous forme de liposomes oligomériques submicroniques, dont la paroi est constituée par les lipides et éventuellement d'une substance A et dont le noyau est constitué par de l'eau ou d'une solution aqueuse, et contenant éventuellement une substance B, caractérisé en ce que : (1) on prépare une phase liquide constituée essentiellement par une solution des lipides et éventuellement de la substance A dans un solvant ou dans un mélange de solvants, et pouvant contenir la substance B en solution, (2) on prépare une seconde phase liquide constituée essentiellement par de l'eau ou une solution aqueuse de la substance B, (3) on ajoute, sous agitation modérée, la première phase à la seconde phase, de manière à obtenir, une suspension colloïdale de liposomes, (4) si l'on désire, on élimine tout ou partie du solvant ou du mélange de solvants et de l'eau, de manière à obtenir une suspension colloïdale de concentration voulue en liposomes.

Applications : médicaments, produits cosmétiques.

**EP 0 349 429 A2**

## Description

## Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles de lipides amphiphiles sous forme de liposomes submicroniques

La présente invention a pour objet un procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles de lipides amphiphiles, sous forme de liposomes oligolamellaires submicroniques.

On connaît de nombreux documents décrivant la préparation et l'utilisation des liposomes, notamment comme véhicules de substances biologiquement actives telles que les médicaments, protéines, enzymes, agents de diagnostic ou produits cosmétiques. Ainsi, des substances hydrosolubles peuvent être encapsulées dans les espaces aqueux du liposome, ou des substances lipophiles peuvent être incorporées dans la paroi lipidique.

Un procédé de préparation de systèmes vésiculaires oligolamellaires a déjà été décrit par Bangham et coll. (J. Mol. Biol. 13, 238-252; 1965). Selon ce procédé, les lipides et les substances lipophiles sont dissous dans un solvant organique et traités par une phase aqueuse sous forte agitation. Toutefois ce procédé, comme la plupart des procédés connus qui en dérivent, ne permet pas d'obtenir directement des liposomes de taille particulière inférieure au micromètre, ce qui permettrait une bien plus grande stabilité des particules et de leurs dispersions.

L'invention fournit un procédé simple et applicable à grande échelle, de préparation de liposomes de taille submicroscopique.

L'invention concerne donc un procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles de lipides amphiphiles, sous forme de liposomes oligolamellaires submicroniques, dont la paroi est constituée par lesdits lipides et éventuellement d'une substance A et dont le noyau est constitué par, de l'eau ou d'une solution aqueuse, et contenant éventuellement une substance B, caractérisé en ce que :

(1) on prépare une phase liquide constituée essentiellement par une solution des lipides amphiphiles et éventuellement de la substance A dans un solvant ou dans un mélange de solvants, et pouvant contenir la substance B en solution,

(2) on prépare une seconde phase liquide constituée essentiellement par de l'eau ou une solution aqueuse de la substance B,

(3) on ajoute, sous agitation modérée, la première phase à la seconde phase, de manière à obtenir, pratiquement instantanément, une suspension colloïdale de liposomes,

(4) si l'on désire, on élimine tout ou partie du solvant ou du mélange de solvants et de l'eau, de manière à obtenir une suspension colloïdale de concentration voulue en liposomes.

La substance A, de nature lipophile, est destinée à modifier les caractéristiques physiques (charge électrique, rigidité) ou chimique de la paroi. Elle peut être du cholestérol, de la stéarylamine, de l'acide phosphatidique, de l'alpha-tocophérol, un tensioactif non ionique, etc...

La substance B est une substance biologiquement active, notamment un principe actif médica-

menteux ou un précurseur médicamenteux, un réactif biologique ou un produit cosmétique. La substance B est introduite dans la phase (1) si elle est lipophile et dans la phase (2) si elle est hydrophile.

Les lipides amphiphiles peuvent être des glycolipides, des phospho-aminolipides, et notamment les phospholipides, par exemple les lécithines (d'oeuf, de soja, etc...).

Le solvant est de préférence un alcool miscible à l'eau en toutes proportions, notamment l'éthanol.

La concentration des lipides dans le solvant peut être de 0,1 à 10% en poids, de préférence 1 à 5% en poids.

Il est avantageux que le volume de solvant utilisé pour la phase (1) soit compris entre 5 et 100%, par exemple environ 50%, du volume d'eau de la phase (2), afin d'obtenir des liposomes de petite taille (notamment de 100 à 300 nm).

On entend par "agitation modérée" une agitation telle que l'agitation magnétique, de 10 à 500 rpm, par exemple environ 100 rpm.

Ainsi l'invention permet d'obtenir des médicaments, notamment sous forme injectable, et des produits cosmétiques qui sont très stables.

Les exemples suivants illustrent l'invention.

## Exemple 1 : Préparation de liposomes.

Phase organique 1  
lécithine de soja (Epikuron 170) 2,0 g  
éthanol absolu 50,0 g

Phase aqueuse 2  
Eau 100,0 g

La phase 1 est ajoutée sous agitation magnétique à la phase 2. Le milieu devient immédiatement opalescent par formation de liposomes. La taille moyenne des liposomes, mesurée immédiatement après préparation, dans un diffractomètre à rayon laser (Nanosizer<sup>®</sup> de Coultronics), est de 180 nm, avec un indice moyen de dispersion de 0,5.

L'alcool est éliminé sous pression réduite, et la suspension de liposome est filtrée sur un verre fritté (pores 9-15 nm).

La taille des liposomes, à nouveau mesurée dans le filtrat demeure inchangée.

L'examen en microscopie à transmission montre des liposomes oligolamellaires de taille homogène.

## Exemple 2 : Préparation de liposomes contenant du cholestérol (variante de l'exemple 1).

On procède comme dans l'exemple 1, mais en ajoutant 0,30 g de cholestérol à la phase alcoolique. Les liposomes obtenus présentant les mêmes caractéristiques que dans l'exemple 1.

## Exemple 3 : Variante de l'exemple 1.

On procède comme dans l'exemple 1, mais en remplaçant la lécithine de soja par de la lécithine

d'oeuf. Les liposomes obtenus présentent les mêmes caractéristiques que dans l'exemple 1.

**Exemple 4 :** Variante de l'exemple 2.

On procède comme dans l'exemple 2, mais en remplaçant la lécithine de soja par de la lécithine d'oeuf. Les liposomes obtenus présentent les mêmes caractéristiques que dans l'exemple 1.

**Exemple 5 :** Préparation de liposomes contenant un principe actif hydrophile.

On procède comme dans l'exemple 2, mais en ajoutant 0,20 g d'ampicilline (sel de sodium) dans la phase aqueuse.

Le taux d'incorporation de l'ampicilline dans les liposomes, mesurée après séparation des liposomes de la phase aqueuse par chromatographie sur gel Sephadex, est de 10%.

**Exemple 6 :** Préparation de liposomes contenant un principe actif lipophile.

On procède comme dans l'exemple 1, mais en ajoutant 66,7 mg de muramyl-tripeptide-cholestérol à la phase organique. Le taux d'incorporation du principe actif est de 100%.

à 3, caractérisé en ce que l'alcool est l'éthanol.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la concentration des lipides dans le solvant est de 0,1 à 10% en poids.

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que la concentration des lipides dans le solvant est de 1 à 5 % en poids.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le volume de solvant de la phase (1) est compris entre 5 et 100 % du volume aqueux de la phase (2).

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que la substance A est le cholestérol.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que la substance B est un médicament hydrosoluble.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que les liposomes ont une taille d'environ 100 à 300 nm.

**Revendications**

1. Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles de lipides amphiphiles, sous forme de liposomes oligolamellaires sub-microniques, dont la paroi est constituée par lesdits lipides et éventuellement d'une substance A et dont le noyau est constitué par de l'eau ou d'une solution aqueuse, et contenant éventuellement une substance B, caractérisé en ce que :

(1) on prépare une phase liquide constituée essentiellement par une solution desdits lipides et éventuellement de la substance A dans un solvant ou dans un mélange de solvants, et pouvant contenir la substance B en solution,

(2) on prépare une seconde phase liquide constituée essentiellement par de l'eau ou une solution aqueuse de la substance B,

(3) on ajoute, sous agitation modérée, la première phase à la seconde phase, de manière à obtenir, pratiquement instantanément, une suspension colloïdale de liposomes,

(4) si l'on désire, on élimine tout ou partie du solvant ou du mélange de solvants et de l'eau, de manière à obtenir une suspension colloïdale de concentration voulue en liposomes.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les lipides amphiphiles sont des phospholipides.

2. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que ledit solvant est un alcool miscible à l'eau en toutes proportions.

4. Procédé selon l'une des revendications 1

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

THIS PAGE BLANK (US)

(19)



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

(11) Numéro de publication:

568  
**0 349 429**  
**A2**

(12)

## DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(21) Numéro de dépôt: 89401857.1

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>: **A 61 K 9/127**

(22) Date de dépôt: 28.06.89

(30) Priorité: 30.06.88 FR 8808874

(43) Date de publication de la demande:  
03.01.90 Bulletin 90/01

(84) Etats contractants désignés:  
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(71) Demandeur: **CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE (CNRS)**  
15, Quai Anatole France  
F-75007 Paris (FR)

(72) Inventeur: **Stainmesse, Serge**  
8 rue Spinoza  
F-94600 Choisy Le Roi (FR)

**Fessi, Hatem**  
9 rue Friant  
F-75007 Paris (FR)

**Devissaguet, Jean-Philippe**  
14 Bd. d'Inkermann  
F-92200 Neuilly sur Seine (FR)

**Puisieux, Francis**  
66 rue de Strasbourg  
F-94700 Maisons-Alfort (FR)

(74) Mandataire: **Varady, Peter et al**  
Cabinet Lavoix 2, Place d'Estienne d'Orves  
F-75441 Paris Cedex 09 (FR)

(54) **Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles de lipides amphiphiles sous forme de liposomes submicroniques.**

(57) Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles de lipides amphiphiles, sous forme de liposomes oligomériques submicroniques, dont la paroi est constituée par les lipides et éventuellement d'une substance A et dont le noyau est constitué par de l'eau ou d'une solution aqueuse, et contenant éventuellement une substance B, caractérisé en ce que : (1) on prépare une phase liquide constituée essentiellement par une solution des lipides et éventuellement de la substance A dans un solvant ou dans un mélange de solvants, et pouvant contenir la substance B en solution, (2) on prépare une seconde phase liquide constituée essentiellement par de l'eau ou une solution aqueuse de la substance B, (3) on ajoute, sous agitation modérée, la première phase à la seconde phase, de manière à obtenir, une suspension colloïdale de liposomes, (4) si l'on désire, on élimine tout ou partie du solvant ou du mélange de solvants et de l'eau, de manière à obtenir une suspension colloïdale de concentration voulue en liposomes.  
Applications : médicaments, produits cosmétiques.

EP 0 349 429 A2



Office européen  
des brevets

# RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numero de la demande

EP 89 40 1857

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.5)
A	STN FILE SUPPLIER (Karlsruhe) & FILE CA & CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 102, 1984, no. 138256u, New York, US; L. RYDHAG et al.: "Colloidal stability of liposomes", & SURFACTANTS SOLUTION, [PROC. INT. SYMP.], 4TH, MEETING DATE 1982, VOLUME 3, 2039-57 * Résumé entier *	1-10	A 61 K 9/127
A	EP-A-0 190 050 (VESTAR RES. INC.) * Page 3, ligne 20 - page 4, ligne 16; page 5, lignes 15-22; page 15, lignes 14-28; revendications 1-3 *	1-10	
X	GB-A-2 002 319 (BATELLE MEMOR. INST.) * Page 1, lignes 26-30; revendications *	1-2, 9-10	
X	EP-A-0 130 577 (DAICHII S. CO.) * Page 4, ligne 17; page 5, lignes 3-16; page 8, lignes 8-10; exemple 2; revendications *	1-10	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
			A 61 K
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 28-05-1990	Examineur BERTE M.J.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

EPO FORM 1503 03.82 (P0402)